

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

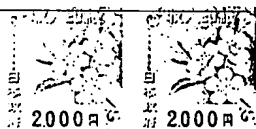
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(4000円)

特 許 願 (特許法第30条第1項の適用を受けようとする出願) (ハ)

昭和50年11月22日

特許庁長官 齊藤英雄 殿

1. 発明の名称

アラキドン酸の製造方法

2. 発明者

住所 東京都新宿区西落合4-5-14
氏名 飯塚 廣 (ほか2名)

3. 特許出願人

住所 東京都新宿区西落合4-5-14
氏名 飯塚 廣

4. 代理人

住所 郵便番号 171
東京都豊島区南池袋二丁目2番5号(英ビル)
氏名 (6946) 弁理士 坂田 順一
電話 (984) 2023

方式 特許 50 139759

明 細 書

1. 発明の名称

アラキドン酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

ベニシリュウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、ロードトルラ属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を、炭水化物または炭化水素を炭素源とし、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸などの脂肪酸を添加した培地に培養してアラキドン酸を生産させることを特徴とする、アラキドン酸の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はアラキドン酸の製造方法、特に醗酵により収率よくアラキドン酸を製造する方法に関する。

従来、炭水化物を炭素源として醗酵によりアラキドン酸を製造することは知られているが、炭化水素を炭素源として醗酵によりアラキドン酸を製造することは知られていなかった。本発明者は炭化水素を炭素源として醗酵によりアラキドン酸を

①9 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 52-64484

④3公開日 昭52.(1977) 5.27

②1特願昭 50-139759

②2出願日 昭50.(1975) 11.22

審査請求 未請求 (全5頁)

庁内整理番号

7110 49

⑤2日本分類

362D224

⑤1 Int.Cl²

C12D 1/02

識別
記号

製造する方法を発明したが、さらに研究の結果、炭水化物または炭化水素を炭素源とする培地にリノール酸、オレイン酸、リノレイン酸などの脂肪酸を添加して、ベニシリュウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、ロードトルラ属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を培養すると、アラキドン酸の生産が増加することを見出し、この知見にもとづき本発明を完成するに到った。

すなわち本発明は、ベニシリュウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、ロードトルラ属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を、炭水化物または炭化水素を炭素源とし、リノール酸、オレイン酸、リノレイン酸などの脂肪酸を添加した培地に培養してアラキドン酸を生産させることを特徴とする、アラキドン酸の製造方法である。

本発明において使用する微生物としては、ベニシリュウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、ロードトルラ属

に属する微生物であつて、炭水化物または（および）炭化水素を酸化しアラキドン酸生産能を有する微生物であればすべて用いることができる。

このような微生物の具体例としては、例えばペニシリウム・シアニウム (*Penicillium cyaneum*) IAM7302, ペニシリウム・リ^ラシナム (*Penicillium li^ラacinum*) IAM7002, ペニシリウム・スピニユロサム (*Penicillium spinulosum*) IAM 7047, クラドスポリウム・ヘルブラム (*Glaucosporium herbarum*) IAM 5059, ホルモデンドラム・ホルデイ (*Hormodendrum hordei*) ATCC 12092, フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) IAM 5009, フザリウム・ソラニ (*Fusarium solani*) IFO 5892, ムコール・アンビガス (*Mucor ambigus*) IFO 6742, アスペルギルス・カンディダス (*Aspergillus candidus*) IAM 2015, アスペルギルス・ニデランス (*Aspergillus nidulans*) IAM 2006, ロードトルラ・グラチニス (*Rhodotorula glutinis*) IAM 4642 等が挙げられる。

上記した具体例の微生物の内、ホルモデンドラム・ホルデイ ATCC 12092 は米国のアメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション (ATCC) に保存され、ATCC

- 3 -

微量元素その他の栄養源を添加することもできる。培地は上記のものを適宜選択組合わせて調製される。

培地に添加するリノール酸、オレイン酸、リノレイン酸などの脂肪酸の量は、0.5~5%、特に0.5~1%が好ましい。上記脂肪酸は培地に始めから添加してもよいが、適当期間、例えば10~13日位培養した後培地に添加してもよく、後者の方が好ましい。

上記微生物の培養は、通常液体培地で、静置培養、振盪培養、通気攪拌培養などにより行われる。培地の PH は 5.5~6.0 がよく、培養は通常 27~32℃ で 13日~17日位行われる。

さらに上記微生物を炭水化物を炭素源とする培地に適当期間、例えば2~4日間位前培養し、この前培養物に炭化水素を加えて培養を続行してもよい。この場合、上記脂肪酸は適当な時期の培地に添加することができるが、上記した前培養物に炭化水素を加えて適当期間、例えば6~7日間位培養した後上記脂肪酸を添加するがよい。

- 5 -

のカタログ（菌株目録）に記載されている微生物であり、これ以外の他の微生物は日本微生物株保存機関連盟 (JFCC) に加入の保存機関に保存され、JFCC のカタログ（菌株目録）に記載されている微生物であつて、いずれの微生物もこれら保存機関から入手することができる。なお IAM は東京大学応用微生物研究所、IFO は大阪府にある財団法人醸酵研究所の略号である。

上記微生物を培養するための培地の炭素源としては炭水化物または炭化水素が用いられる。そして炭水化物としては、例えばブドウ糖、蔗糖、澱粉などが用いられ、また炭化水素としては、例えばケロセン、n-アルカン ($C_{10} \sim C_{15}$)、n-デカン、ウンデカン、ヘキサデカン、ヘプタデカンなどが用いられる。また窒素源としては、例えば NH_4NO_3 , $NaNO_3$ などのような無機窒素源または尿素、ペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、コーン・スチープ・リカーなどの有機窒素源が用いられ、無機塩としては、例えば K_2HPO_4 , KCl , $FeSO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ などが用いられる。その他必要に応じて微

- 4 -

かくして培養物中にアラキドン酸が生産されるので、培養物からアラキドン酸を採取する。アラキドン酸の採取に当つては、培養物よりそのまま採取してもよいが、アラキドン酸は微生物の菌体中に含まれるので、培養物より菌体を分離し、この菌体よりアラキドン酸を採取するのが好適である。

アラキドン酸の採取は、アラキドン酸を分離、精製する常法、例えば溶剤抽出、クロマトグラフィーなどによつて行なわれる。

このようにして本発明によれば、炭素源として炭水化物を用いるとき、上記の脂肪酸を添加しない場合に比較して50~60%のアラキドン酸の生産の増加、また炭素源として炭化水素を用いるとき、上記脂肪酸を添加しない場合に比較して60~70%のアラキドン酸の生産の増加が得られ、炭水化物で前培養した後、前培養物に炭化水素を加えて培養を続行する場合には更に高いアラキドン酸の生産の増加が得られる。

次に、本発明の実施例を示すが、本発明はこれ

- 6 -

により制限されるものではない。

実施例 1

グルコース 30g, NaNO_3 1g, K_2HPO_4 0.5g, KCl 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, イースト・エキストラクト (Difco) 10g, カザミノ酸 (Difco) 2g を蒸留水 1000 ml に混合した培地を $\text{pH} 5.5$ に調整し、その 200 ml を 500 ml 三角フラスコに入れ、ベニシリウム・シアニウム IAM 7302 を接種し、 $27 \sim 32^\circ\text{C}$ で 10 日～12 日間培養した。この培養後、培地にリノール酸 3 ml を無菌的に添加し、さらに 3～4 日間培養を行つた。

培養後、濾過法で菌体を集め、凍結乾燥したのち、MSKタイプの細胞粉砕器 (Braun Melsungen, West Germany) で 4°C 下で粉末状とした。この粉末状菌体の化学分析の結果、粗脂肪 8.2%、粗蛋白 36.0% で、全脂肪酸の 5.5% がアラキドン酸であることが認められた。これに対し、培地にリノール酸を添加しない以外は上記と同様に実施した場合に得た粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸は 2.3% であつた。

- 7 -

たもの 200 ml を 500 ml 三角フラスコに入れ、これにベニシリウム・シアニウム IAM 7302 を接種して $27^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$ で 10 日間静置培養を行つた。この培養物に 3 ml のリノール酸を無菌的に添加し、さらに 3～4 日間培養した。

培養後、実施例 1 に記載したと同様にして粉末状菌体を得た。この粉末状菌体の化学分析の結果、粗脂肪 9.6%、粗蛋白 26% で、全脂肪酸の 7.1% がアラキドン酸であることが認められた。これに対し、培地にリノール酸を添加しない以外は上記と同様に実施した場合に得た粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸は 5.0% であつた。

上記のように得た粉末状菌体より実施例 1 に記載したと同様にしてアラキドン酸を採取した。

実施例 3

グルコース 10g, NaNO_3 1g, K_2HPO_4 0.5g, KCl 0.1g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, イースト・エキストラクト 5g, コーン・ステープ・リカー 5g を 1000 ml の蒸留水に混合し、高圧滅菌したのち、200 ml を 500 ml 三

- 9 -

上記の粉末状菌体を、4% $\text{HCl}-\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液で 100°C で 3 時間抽出し、これに水を少量加えて石油エーテルで 3 回抽出操作をくり返し、脂肪酸メチルエステル画分を得た。得られた画分をトリメチル化してガスクロマトグラフィー (島津 GC-4B) で分析しアラキドン酸を確認した。この脂肪酸メチルエステル画分をアルミナカラムに吸着させ、アセトン-メタノールで溶出してアラキドン酸画分を採取した。

このアラキドン酸画分と標準アラキドン酸 (純度 95%) をガスマススペクトラム (日本電子)、赤外線吸収スペクトラム (島津 IR400)、薄層クロマトグラフィーにて同定、定量を行つたところ、上記アラキドン酸画分はアラキドン酸であることを確認した。

実施例 2

クロセン 30 ml, NaNO_3 1g, K_2HPO_4 0.5g, KCl 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, イースト・エキストラクト (Difco) 10g, カザミノ酸 (Difco) 2g を蒸留水 1000 ml に混合して培地とし、 $\text{pH} 5.5$ に調整し

- 8 -

角フラスコに分注し、ベニシリウム・シアニウム IAM 7302 を接種して $27^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$ で 3～4 日間静置培養し、これにクロセン 20 ml を無菌的に添加して 6～7 日間培養を行つた。この培養後、この培地にリノール酸 3 ml を無菌的に添加して、さらに 3～4 日間培養した。

培養後、実施例 1 に記載したと同様にして粉末状菌体を得た。この粉末状菌体の化学分析の結果、粗脂肪 12.5%、粗蛋白 31% で、全脂肪の 7.5% がアラキドン酸であることが認められた。これに対しリノール酸を添加しない以外は上記と同様に実施した場合に得た粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸は 7.0% であつた。

上記のようにして得た粉末状菌体より実施例 1 に記載したと同様にしてアラキドン酸を採取した。

実施例 4

ベニシリウム・シアニウム IAM 7302 を接種する代りに、次の各菌株を接種する以外は実施例 3 に記載したと同様にして培養および菌体の分離を行い、粉末状菌体を得た。この粉末状菌体における

- 10 -

全脂肪酸に対するアラキドン酸のパーセントは次の通りである。なお比較のため、リノール酸を添加しない以外は上記と同様に実施した場合に得た粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸のパーセントも次に記載する。

微生物	リノール酸添加	リノール酸無添加
ベニシリウム・リラシナム IAM 7002	3.1%	2.8%
ベニシリウム・スピニユロサム IAM 7047	3.7%	3.5%
クラドスポリウム・ヘルブラム IAM 5059	1.9%	1.8%
ホルモデンドラム・ホルデイ ATCC 12092	3.3%	3.0%
フザリウム・オキソボラム IAM 5009	2.8%	2.5%
フザリウム・ソラニ IFO 5892	2.9%	2.5%
ムコール・アンビガス IFO 6742	2.2%	2.0%
アスペルギルス・カンディダス IAM 2015	4.3%	3.9%

- 11 -

ベニシリウム・スピニユロサム IAM 7047	3.9%	3.5%
クラドスポリウム・ヘルブラム IAM 5059	2.0%	1.8%
ホルモデンドラム・ホルデイ ATCC 12092	3.5%	3.0%
フザリウム・オキソボラム IAM 5009	3.1%	2.5%
フザリウム・ソラニ IFO 5892	2.9%	2.5%
ムコール・アンビガス IFO 6742	2.4%	2.0%
アスペルギルス・カンディダス IAM 2015	4.1%	3.9%
アスペルギルス・ニデランス IAM 2006	4.2%	3.8%
ロードトルラ・グラチニス IAM 4642	3.6%	3.1%

上記のようにして得た各粉末状菌体より実施例1に記載したと同様にしてアラキドン酸を採取した。

実施例 6

ベニシリウム・シアニウム IAM7302 を接種する

- 13 -

アスペルギルス・ニデランス IAM 2006	3.9%	3.8%
ロードトルラ・グラチニス IAM 4642	3.5%	3.1%

上記のようにして得た各粉末状菌体より実施例1に記載したと同様にしてアラキドン酸を採取した。

実施例 5

ベニシリウム・シアニウム IAM 7302 を接種する代りに、次の各菌株を接種し、リノール酸の代りにオレイン酸を添加する以外は実施例3に記載したと同様にして培養および菌体の分離を行い、粉末状菌体を得た。この粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸のパーセントは次の通りである。なお比較のため、オレイン酸を添加しない以外は上記と同様に実施した場合に得た粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸のパーセントも次に記載する。

	オレイン酸添加	オレイン酸無添加
ベニシリウム・リラシナム IAM 7002	3.3%	2.8%

- 12 -

代りに、次の各菌株を接種し、リノール酸の代りにリノレイン酸を添加する以外は実施例3に記載したと同様にして培養および菌体の分離を行い、粉末状菌体を得た。この粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸のパーセントは次の通りである。なお比較のため、リノレイン酸を添加しない以外は上記と同様に実施した場合に得た粉末状菌体における全脂肪酸に対するアラキドン酸のパーセントも次に記載する。

	リノレイン酸添加	リノレイン酸無添加
ベニシリウム・リラシナム IAM 7002	3.0%	2.8%
ベニシリウム・スピニユロサム IAM 7047	4.0%	3.5%
クラドスポリウム・ヘルブラム IAM 5059	2.1%	1.8%
ホルモデンドラム・ホルデイ ATCC 12092	3.3%	3.0%
フザリウム・オキソボラム IAM 5009	3.0%	2.5%

- 14 -

フザリウム・ソラニ IFO 5892	3.1%	2.5%
ムコール・アンビガス IFO 6742	2.6%	2.0%
アスペルギルス・カンディダス IAM 2015	4.3%	3.9%
アスペルギルス・ニデランス IAM 2006	4.0%	3.8%
ロードトリラ・グラチニス IAM 4642	3.2%	3.1%

上記のようにして得た各粉末状菌体より実施例
1 に記載したと同様にしてアラキドン酸を得た。

出願人 飯 塚 廣

代理人 弁理士 坂 田 順 一

5. 添 附 書 類 の 目 録

- (1) 明 細 書 / 通
- (2) 委 任 状 / 通
- (3) 特許法第30条第1項の適用を受けようとする書面 / 通
- (4) 特許出願に係る発明が刊行物に発表
した発明であることを証明する書面
〔昭和50年6月20日 社団法人
日本農芸化学会発行「講演要旨集
(昭和50年度大会)」第132頁(写)〕 / 通
- (5) 特許出願に係る発明が特許庁長官が
指定する学術団体が開催する研究集
会において文書をもつて発表した発
明であることを証明する書面
〔社団法人日本農芸化学会の証明書〕 / 通
- (6) JFCC カタログ・オブ・カルチュアズ
アデイショナル・エディション 1966
第11頁, 第20頁, 第59頁, 第80頁,
第81頁, 第106頁, 第125頁, 第128
頁, 第132頁, 第158頁(写) / 通
- (7) ザ・アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション
カタログ・オブ・ストレインズ エイツ・エディション
1968 第96頁(写) / 通
- (8) 願 書 副 本 / 通

— 15 —

6. 前記以外の発明者

カワナキ タ マ ク オウゼン
住 所 神奈川県川崎市多摩区王禅寺568
氏 名 オオ トモ トシ テカ
大 友 俊 允
スギナミク ナリタ ニシ
住 所 東京都杉並区成田西3-7-2
氏 名 シノ ダ コウ サク
吉 田 耕 作

証 明 書

昭和50年10月24日

特許庁長官

廣 藤 英 雄 殿

社団法人 日本農芸化学会

会長 芦 田

本会開催による昭和50年7月23日の昭和50年度日本農
芸化学会大会において、大友俊允、吉田耕作、飯塚廣は、
の文書をもつて発表したことを証明いたします。